

検体検査

Examination of Ocular Samples

杉田 直*

はじめに

眼科の失明原因となる代表疾患にぶどう膜炎や感染性眼内炎がある。また、これらの疾患と鑑別がむずかしい眼内リンパ腫は生命予後に直結する疾患である。近年、ウイルス学や分子生物学の進歩により眼科領域でも原因不明の疾患に多岐にわたる外来性抗原(ウイルス, 細菌, 真菌, 寄生虫, 腫瘍など)が関与していることが判明してきた。これらの眼炎症性疾患の誤った診断に基づく不適切な治療は重大な視機能障害を残すが、適切な診断・治療は容易ではない。また、眼の検体を用いた診断にいくつかの問題があるのが現状である。たとえば、眼検体を用いた診断のジレンマとして常に微量な検体量であること、原因となる抗原が多種多様であること、感染性眼炎症性疾患(眼内炎, 角膜炎など)は進行が急激なケースがあり診断および治療は時間との闘いであること、リンパ腫は生命予後に直結する疾患であるがその診断が容易ではないこと、などがあげられる。このように正確かつ迅速であり、また多岐にわたる外来性抗原を網羅する包括的な眼検体を用いた診断が必要であった。加えて、ぶどう膜炎や眼内炎などの眼炎症性疾患の全身検査所見は参考程度にしかならない場合があり、その診断のために眼局所の直接的な状況証拠(=原因抗原の同定、特異抗体の同定など)を得る必要があるのは事実である。

筆者らの施設では、その微量な検体を用いて、これらの難治性眼炎症性疾患の病因となる多様な外来抗原を網羅的にスクリーニングし診断する検査システムを開発し、

正確な診断とそれに合う適切な治療を行うことを検討している。眼感染症は失明、眼内リンパ腫は生命予後に関わるので正確、迅速、かつ網羅的な診断検査システム開発は必要不可欠であると思われる。本稿では、この新しい検査の動向を含めてぶどう膜炎などの眼炎症疾患の眼局所の検体検査を紹介する。

I 新しいPCR検査：マルチプレックスPCRとリアルタイムPCR

近年、新しいPCR(polymerase chain reaction)検査として多項目迅速定性PCR(別名、マルチプレックスPCR)と定量PCR(リアルタイムPCR)が出現した。筆者らは、ヒトヘルペスウイルス1~8型のマルチプレックスPCRとリアルタイムPCRを組み合わせた遺伝子検査システムを確立し、その有効性についての報告を行った^{1,2)}。

PCRの具体的な方法は、マルチプレックスPCRはそれぞれの抗原となる特異的プライマーを用いて、ロッシュ社のLightCyclerという機械でPCRを行う(図1)。PCR後、プローブの混合液とPCR産物を混合し、グラフ(melting curve)解析を行い、ウイルスなどの抗原DNAの検出を行う。これらはT_m値(melting temperature, 融解温度)が重ならないように設定したプローブによってその種類を判定するのが特徴である(図2)。以前の定性PCRではゲル内の増幅バンドで判定していたが、それとは異なり図2のような融解曲線グラフで判

* Sunao Sugita : 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科眼科学分野

(別刷請求先) 杉田 直 : 〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科眼科学分野

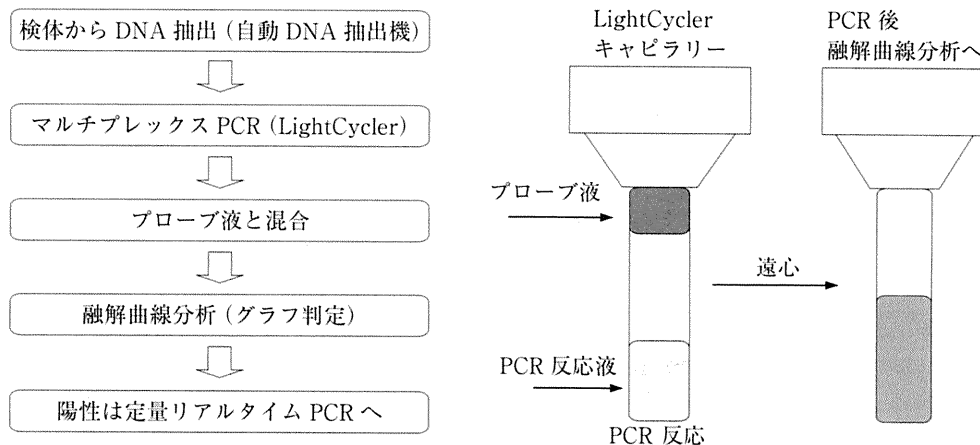


図1 マルチプレックス PCR 検査法

マルチプレックス PCR (multiplex PCR: 多項目迅速 PCR) 検査は、数種類 (多い場合は 10 種類以上が可) のウイルスなどの外来性抗原を同時に迅速に検出できる新しい PCR 検査システム。眼局所検体から DNA を抽出後、accuprime Taq を用いてそれぞれの抗原 DNA 特異的プライマーを混合して、マルチプレックス PCR を行う。数種類の抗原を数本のキャピラリーを用いて同時に検査する。PCR 反応後、ハイブリダイゼーションプローブの混合液と PCR 産物を混合し、融解曲線分析を行い、抗原 DNA の同定を行う。

定する。この PCR の利点は、陽性曲線グラフが大きい場合は眼局所の抗原量が多いことがわかり半定量できること、サンプル調整から PCR にかかる所要時間はわずか 1 時間 40 分程度ととても迅速であること、10 項目以上の外来性抗原 DNA が同時に陽性か陰性かの判定ができ、スクリーニング検査として使用できること、などがあげられる。その他の利点は、眼表面炎症性疾患 (角膜炎、結膜炎など) の涙液検体は複数の外来性抗原が検出される可能性があり、この PCR は有用である。

上記定性 PCR スクリーニング検査で陽性であった外来抗原に関してその定量化を行うが、リアルタイム PCR を用いて解析する。PCR の機械はいろいろ販売されているが、筆者らは LightCycler もしくは ABI 社 7300 system で定量 PCR を行っている。偽陽性を避ける目的で、プライマーとプローブ配列はマルチプレックス PCR とは異なるように設定している。定量リアルタイム PCR の最大の利点は、治療前に眼局所の DNA コピー数を把握できるために治療薬の量の決定、使用タイミングの参考になる。また、何度か検体を採取できる場合、眼局所コピー数の推移によって治療薬の用法の参考となる。定量 PCR で診断された真菌性眼内炎の PCR 結果を図 3 に示した。眼局所の真菌 28S rRNA のコピー

数が高値であったことから、この PCR 結果が診断だけではなく治療方針の参考になった症例である。

今までは国内外での眼検体を用いた PCR は眼局所の各病原体の定性または定量 PCR 検査のみで、この検査のように多項目を同時にかつ迅速に眼の微量検体から行う報告はほとんどなされていない。さらに、原因不明の難治性眼炎症疾患の検体から多種類の外来性抗原感染の有無をスクリーニングができるので、感染症が除外でき、症例によってはステロイド中心の抗炎症療法を行えるようになる。

II 新しい PCR 検査: ブロードレンジ PCR

近年、細菌全般を網羅するための細菌保存領域を増幅させるブロードレンジ PCR (細菌 16S rRNA gene) が行えるようになった (図 4)。真菌全般保存領域の増幅は、真菌 28S リボソーム RNA 領域のブロードレンジ PCR (真菌 28S rRNA gene) が行われる。ブロードレンジ PCR は、リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子を標的にした PCR で、原核生物では 16S rRNA、真核生物では 18S/28S rRNA といったそれぞれの種で保存された遺伝子を標的にしたものである。ほとんどの細菌が保有する遺伝子であるハウスキーピング遺伝子、16S rRNA

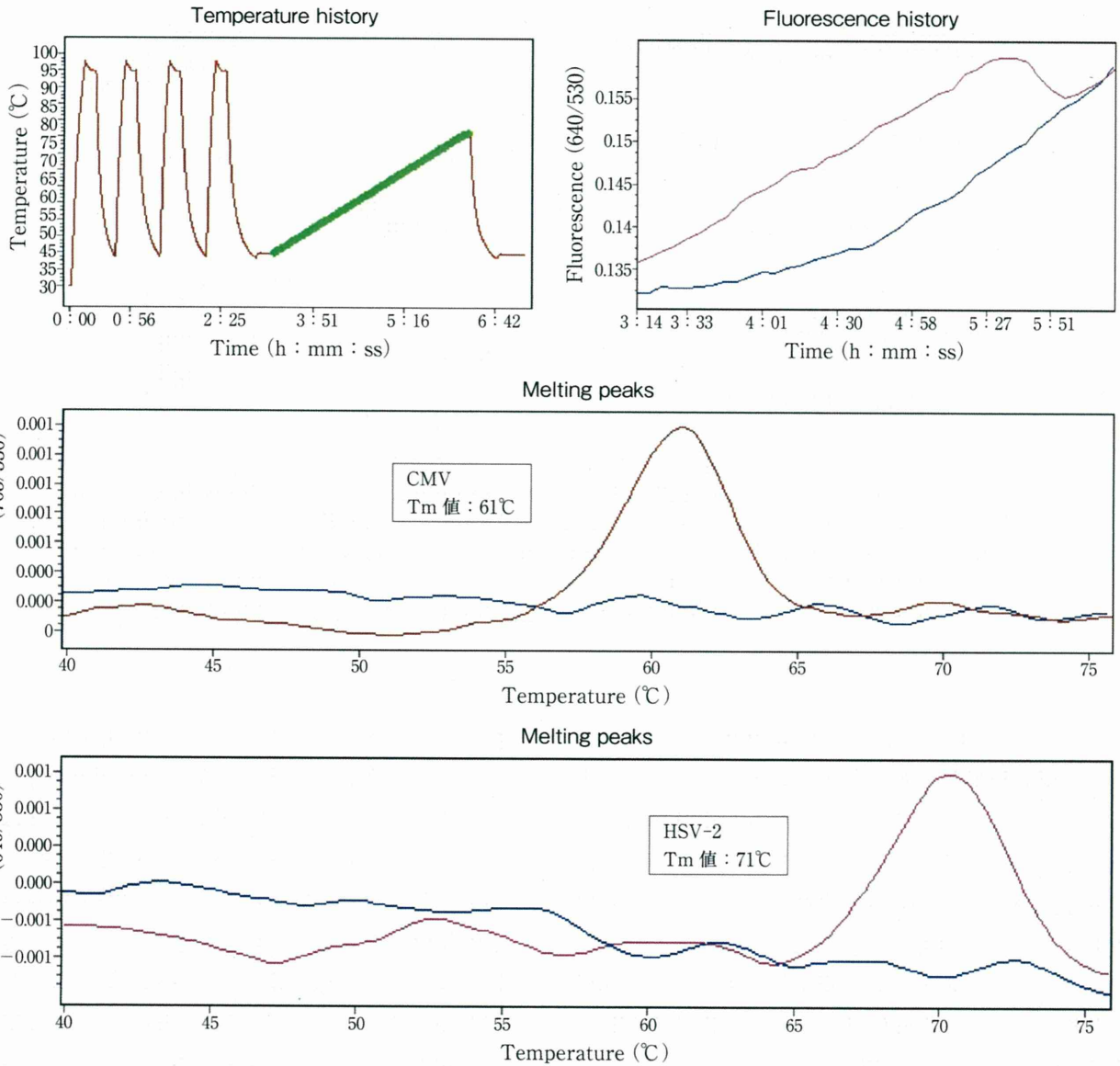
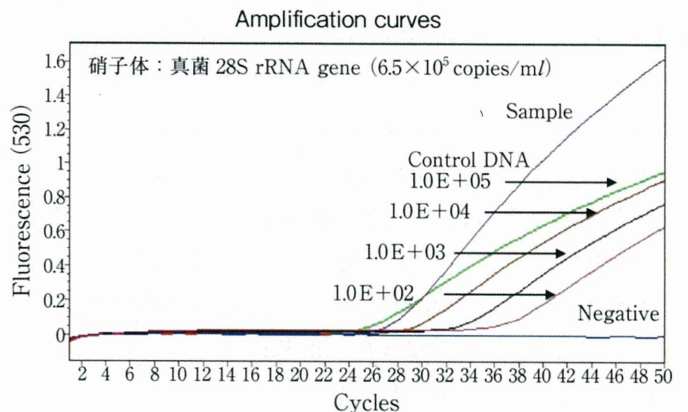


図2 マルチプレックスPCR結果のグラフ

融解曲線カーブで陽性が陰性かの判定を行う。たとえばCMV-DNAはT_m値が約61°Cで曲線が検出されるように設定している。HSV2-DNAのT_m値は71°Cで、この場合は検体内にHSV2-DNAが検出されていることがわかる。同時にHSV2以外の他のヘルペスウイルスDNA(HSV1, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8)はすべて陰性であることが判明する。

図3 定量リアルタイムPCRで診断された代表症例のPCR結果

定量PCRで診断された真菌性眼内炎のPCR結果のグラフ。コピー数の算出方法は、未知DNA濃度のテストサンプル(眼検体)と検量線作成のためのスタンダードサンプル(control DNA)を同じ条件下でPCRをかけて解析し、サンプルのC_t値を算出して検量線に当てはめることでそのサンプル内のDNA濃度を知ることができる。この硝子体液の真菌28S rRNAのコピー数は 6.5×10^5 copies/mlと高値であった。



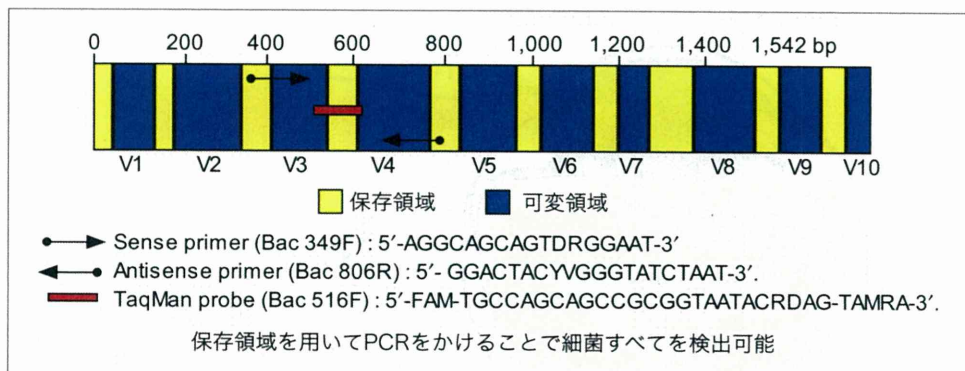


図4 ブロードレンジ定量PCRの原理, 方法

細菌16S rRNA領域の特異的なプライマーとTaqManプローブを設計し, 定量PCR検査を構築した. 細菌の配列には保存領域(非可変領域)と可変領域が交互に存在し, 保存領域をPCRで増幅させる.

(リボゾームの蛋白合成に関与, 真菌の場合は18S/28S)はよく用いられるハウスキーピング遺伝子の一つであり, これを検出することで菌の存在が証明できる. このブロードレンジPCRを用いて, 検体から細菌や真菌を迅速に検出できるようになった. また, 定量PCRを組み合わせることで菌の定量化ができ, さらにこの遺伝子のシーケンス解析を行うことで, 菌の同定までが可能である. たとえば細菌では, 菌すべてが共通で保有する遺伝子領域(保存領域)と菌種によって異なる遺伝子領域(非保存領域:可変領域)が交互に存在し, その領域に16S rRNAがあり, その保存領域を使用してPCRを行うと理論的には細菌すべてを検出できる(図4). 実際には, 世の中に存在する3万種以上の細菌の約60~80%を網羅できるとされ, 眼科以外の臨床の場でも非常に重要な検査になっている. このPCR陽性検体は, 16S rRNA領域を増幅させて, 直接シーケンスして, その結果をGenBankデータベースでプラスト解析

(用語解説)を行い菌の同定までを行う. このプラスト解析は多少の問題はあるが, 今後一般的な細菌培養検査より迅速に菌の同定まで行えるようになることが期待されている. 筆者らは, この細菌16S PCRとリアルタイム定量PCR, およびプラスト解析を組み合わせた遺伝子検査システムを確立し, 細菌性眼内炎検査に応用し, その有効性についての報告を行っている³⁾.

III 検体を用いた検査の流れ

具体的な眼局所の検体検査の流れを図5にまとめた. 対象疾患は, 眼炎症疾患すべてとなる. 感染性ぶどう膜炎, 網膜血管炎, 感染性眼内炎, 眼内リンパ腫などの活動性眼内炎症を有する患者からインフォームド・コンセントを得て前房水, 硝子体, 場合によっては虹彩や網膜などの眼内組織を採取する. 角膜炎, 結膜炎などの眼表面炎症性疾患では, 角膜擦過物や涙液, 結膜組織などを採取する.

検体量は, 眼内液0.1mlあれば図5に示すほとんどの検査を行うことが可能である. 検体の処理は, 検体を遠心分離し, 沈渣の細胞成分は核酸DNAを抽出, もしくは鏡検(スメア), 検体の上清はPCR以外の検査(サイトカイン測定, 特異抗体測定, 培養など)に使用する. 眼内リンパ腫では一部の細胞を一般的な病理検査, フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原解析に使用する. また, サルコイドーシスなどの非感染性ぶどう膜炎でも感染を否定する目的で検体を採取する場合がある. いずれの場合も検体量が少ないので効率的に使用する必要がある.

■用語解説■

プラスト解析:細菌16S定量PCRでの陽性検体は, 菌の同定目的でプラスト解析(BLAST:basic local alignment search tool)を行っている. 細菌16S rRNA遺伝子のPCRによる増幅は, 25Fプライマーを用いて16S rDNAの前半約500bpを解析する. その増幅したPCR産物をGenBankデータベースでダイレクトシーケンスする. シーケンシングにはABIアナライザーを用いて配列を解析し, その後GenBank BLASTで一致性を検索する. 100%一致(あるいは98%以上)する菌を同定菌としている. この検査を用いれば一般的な細菌培養検査より早期に菌の同定まで行えるようになる.

涙液, 角膜組織など: 角膜炎/結膜炎

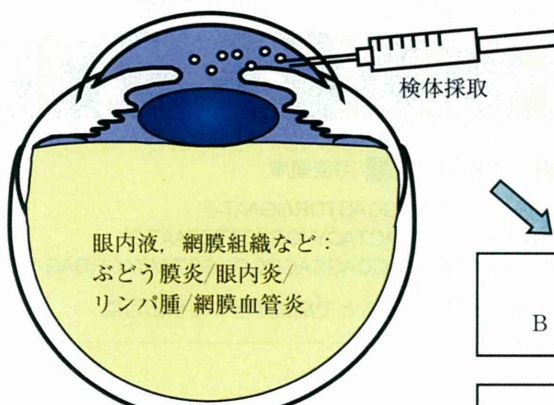
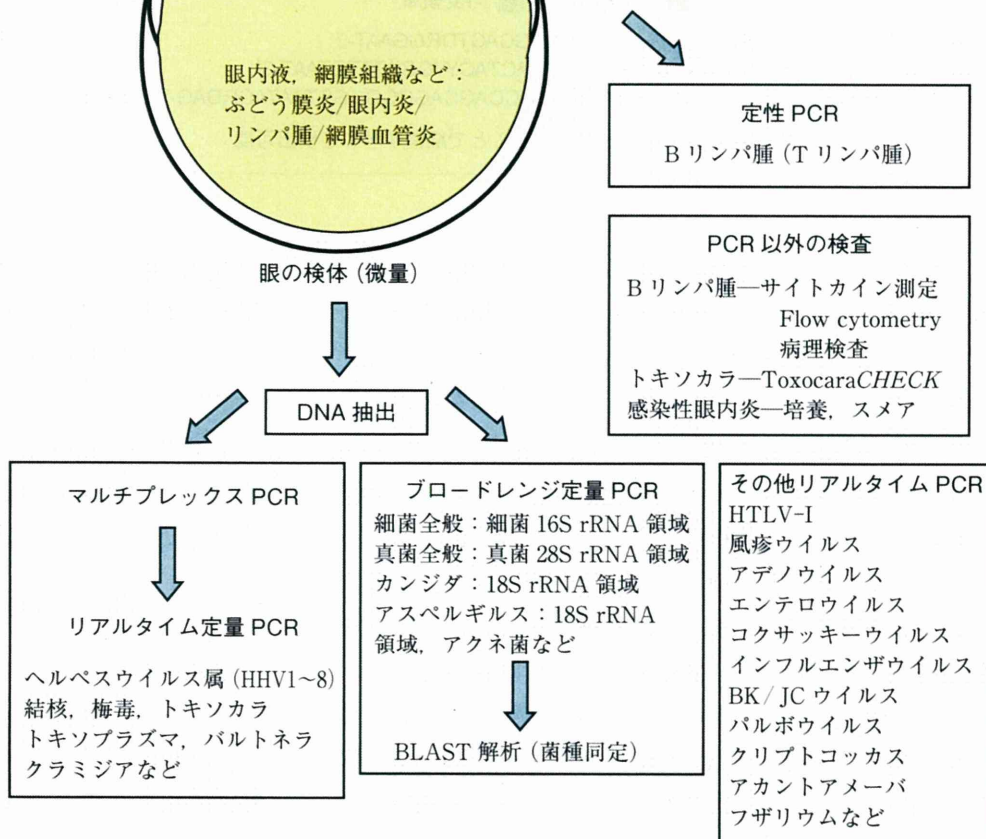


図5 眼炎症性疾患に対する網羅的PCR診断システムの検査の流れ

眼炎症性疾患から検体を採取して, 細胞成分は核酸DNAを抽出, 上清はPCR以外の検査(サイトカイン測定, 特異抗体測定, 培養など)に使用する. PCRは2つのステップでスクリーニングを行う. ①ウイルスおよびぶどう膜炎マルチプレックスおよびリアルタイムPCR, また②細菌全般(細菌16S)および真菌全般定量PCR(真菌18S/28S)をブロードレンジ定量PCRで行う. その他, 必要な場合のみ各種ウイルスなどの定量PCRを施行する. 眼内リンパ腫では一部の細胞を一般的な病理検査, フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原解析に使用し, 上清はサイトカイン測定を行う. PCRスクリーニング検査は迅速(24時間以内)に行う. その後の別の検査も48時間以内を目標とする.



1. 細菌性眼内炎の診断

細菌性眼内炎の診断には, 一般的な培養, グラム染色, ギムザ染色に加えて, PCRを行う. PCRは, 細菌保存領域を増幅させるブロードレンジPCR(細菌16SリボゾームRNA領域)にて行う(図5). このPCR陽性検体は, 16S rRNA領域を増幅させて, 直接シークエンスして菌の同定までを行う. 眼科の遅発性眼内炎の代表細菌 *Propionibacterium acnes* (アクネ菌) は培養検査では嫌気性菌のため同定されにくい, あるいは培養結果に時間を要することから定量PCR検査が有用である.

2. 真菌性眼内炎の診断

真菌が疑われる場合, 真菌培養, スメアおよびブロードレンジPCR(真菌全般保存領域の増幅: 真菌28SリボゾームRNA領域)が行われる(図5). その他, 眼科

関連性が高いと思われるカンジダ, アスペルギルス, フザリウムのそれぞれの定量PCRも行う.

3. ウイルス性ぶどう膜炎の診断

ウイルスの診断は, ヘルペスウイルス属1型から8型[HSV(herpes simplex virus)-1, HSV-2, VZV(varicella-zoster virus), EBV(Epstein-Barr virus), CMV(cytomegalovirus), HHV(human herpes virus)6, HHV7, HHV8]までとレトロウイルスでぶどう膜炎の原因の human T-cell leukemia virus 1: HTLV-I(proviral DNA)の検索を行う(図5). オプション検査として, アデノウイルス, エンテロウイルス, コクサッキーウイルス, 風疹ウイルス, また眼科関連性は不明のBKウイルス, JCウイルス, パルボウイルスB19, イ

ンフルエンザウイルスに関しても PCR を用いて検討する
 ことがある。ヘルペスウイルス属はいずれもマルチプ
 レックス PCR でスクリーニングして、陽性ウイルスの
 みリアルタイム PCR を用いてゲノムの眼局所の定量を
 行う。ウイルス感染の場合は PCR 検査が最も有効で、
 疾患によっては Q 値測定 (眼内特異抗体測定) を行う。

4. 眼内寄生虫の診断

眼内寄生虫の診断には、代表的なトキソプラズマとト
 キソカラの検査を行う。眼トキソプラズマ症は定性・定
 量 PCR を用いて眼内ゲノムの同定を、眼トキソカラ症
 (イヌ回虫, ネコ回虫) はトキソカラチェック (Toxocara
 CHECK, 簡易抗体定性検査) を用いて眼内特異抗体の
 同定および PCR も行う (図 5)。トキソプラズマの場合
 PCR が有効であるが、トキソカラは筆者らの経験では
 PCR でゲノムを同定するよりも眼内特異抗体の証明が
 有用である。

5. その他ぶどう膜炎/角膜炎/結膜炎の原因となる 疾患の診断

ぶどう膜炎の原因となる病原体で、結核、梅毒トレポ
 ネーマ、バルトネラ菌 (ネコひっかき病)、角膜炎に梅
 毒トレポネーマ、結膜炎にクラミジアがある (図 5)。こ

れらの外来性抗原の定性および定量 PCR を用いてゲノ
 ムの同定を行うが、全身検査も有効 (たとえば、結核で
 はツベルクリン皮内テスト) である。アカントアメーバ
 角膜炎の症例検体では、角膜擦過物の鏡検が有用で、加
 えて定量 PCR を補助検査として用いる。

6. 眼内腫瘍の診断

仮面症候群を呈する眼内リンパ腫と白血病眼内浸潤の
 診断は重要である。一般的な病理診断以外に、眼内液を
 利用した PCR で Ig (免疫グロブリン) H 再構築 (B 細胞系)
 および TCR (T 細胞受容体) 再構築 (T 細胞系) を
 行う (図 5)。PCR で陽性の検体はサザンプロットで二
 重解析を行う。同時に検体の上清を使用して ELISA
 (enzyme-linked immunosorbent assay) によるサイト
 カイン測定を行うが、この IL-10, IL-6 の値も補助診
 断として有用である。

IV PCR が診断に有用であった代表症例

〔症例 1〕 53 歳, 男性。芝刈り後の眼内炎疑いで紹
 介, 受診。右眼手動弁, 前房蓄膿の激しい眼内炎症がみ
 られた (図 6)。硝子体を用いた検査では、培養でエンテ
 ロコッカス属が検出され、塗抹でグラム陽性球菌が同定
 された。硝子体の細菌 16S PCR で、細菌 DNA が高コ



硝子体を用いた検査
 培養: *Enterococcus faecalis*
 塗抹: グラム陽性球菌

最終診断: 外傷性細菌性眼内炎

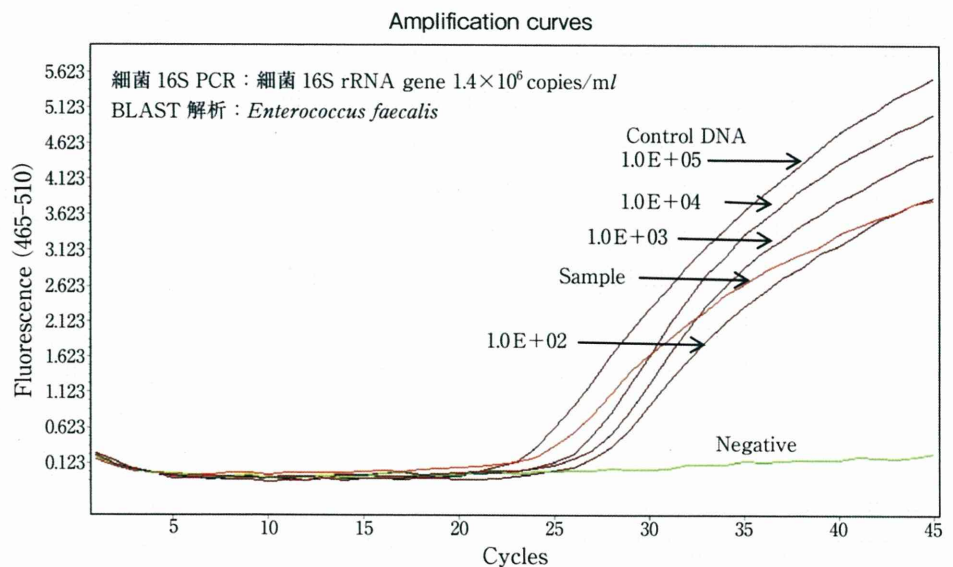
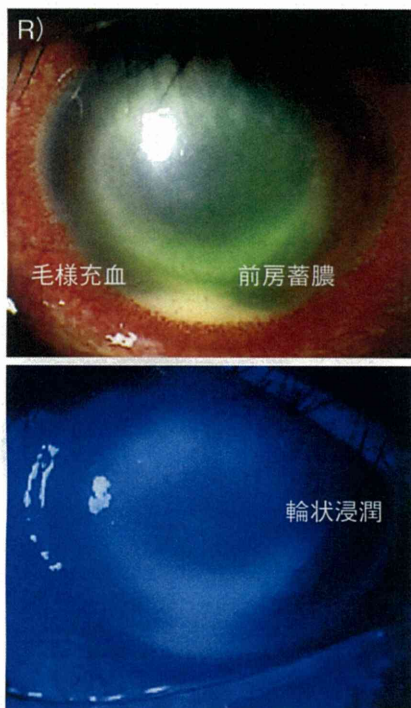


図 6 外傷性細菌性眼内炎の症例

硝子体検体の細菌 16S PCR で、細菌 DNA が 1.4×10^6 copies/ml と高コピー数検出されていた。



最終診断：アcantアメーバ角膜炎

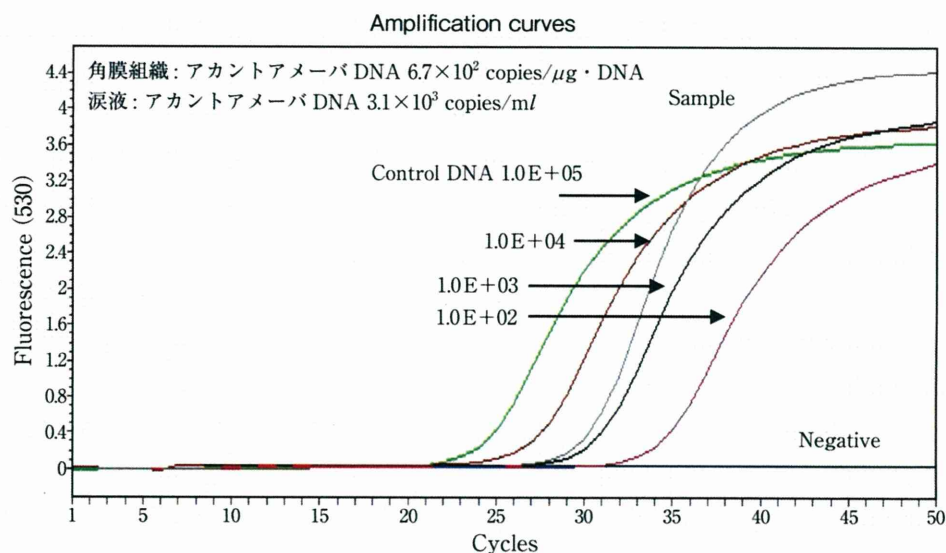


図7 アcantアメーバ角膜炎の症例

前房蓄膿がみられるアcantアメーバ角膜炎のまれな症例。当初近医ではヘルペス性ぶどう膜炎の疑いで治療を受けていた。角膜擦過物、涙液の定量PCRで、アcantアメーバDNAがそれぞれ 6.7×10^2 copies/ $\mu\text{g} \cdot \text{DNA}$ 、 3.1×10^3 copies/mlと陽性を示した。また、その他の外来性抗原（ヘルペスウイルスDNAなど）はいずれも陰性であった。

ピー数を示していた。手術時の所見や画像上では眼内異物が発見できなかったが、最終診断は外傷性細菌性眼内炎とした。その後のプラスト解析にて *Enterococcus faecalis* が同定された。

〔症例2〕 33歳、男性。ヘルペス性角膜炎/ぶどう膜炎の疑いで紹介、受診。右眼光覚弁、前房蓄膿、激しい毛様充血、角膜浸潤のみられる眼内炎症がみられた(図7)。角膜擦過物の検査では、直接検鏡にてパーカーインクKOH法でアcantアメーバのシストが同定された。同時期の角膜擦過物、涙液の定量PCRで、アcantアメーバDNAが陽性で、補助診断に有用であった。その後、数回の角膜擦過物の検査でDNA陽性が続いたが、治療に反応し炎症が沈静化したころPCRで陰性となった。

おわりに

この新しい検体検査システムの期待される効果として、眼炎症の原因となる外来性抗原を迅速に短時間で同定することができ、早期治療へとつながる。また、眼局

所の遺伝子の定量化を行い治療薬の決定や量の参考となる。そのうえ原因不明の眼炎症性疾患から新しい外来性抗原の同定される可能性があり、筆者らもHHV6関連汎ぶどう膜炎の報告を行った⁴⁾。さらには原因特定以外に感染性疾患や腫瘍性疾患を除外することができることから、臨床場で重要な検査となることが期待される。

文 献

- 1) 杉田 直, 岩永洋一, 川口龍史ほか: 急性網膜壊死患者眼内液の多項目迅速ウイルスPCRおよびリアルタイムPCR法によるヘルペスウイルス遺伝子同定. *日眼会誌* **112**: 30-38, 2008
- 2) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K et al: Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol* **92**: 928-932, 2008
- 3) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K et al: Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* **95**: 345-349, 2011
- 4) Sugita S, Shimizu N, Kawaguchi T et al: Identification of human herpesvirus 6 in a patient with severe unilateral panuveitis. *Arch Ophthalmol* **125**: 1426-1427, 2007

ぶどう膜炎の網羅的診断法

杉田 直

ここが変わった!

以前の常識

- 眼内液を用いたぶどう膜炎の診断検査では、得られる検体はごく微量しかなく、PCR を行っても 1~2 項目が限度であり、また検査感度もよくなかった。

現在の常識

- このような微量検体でも迅速に網羅的に多くの項目の核酸を検査できるシステムが構築され、臨床応用された (マルチプレックス PCR)
- さらにその核酸の量を定量化する検査が出現した (リアルタイム PCR)。
- また、細菌全般、真菌全般を網羅する PCR 検査も可能になった (ブロードレンジ PCR)。

はじめに

眼科の失明原因となる炎症性の代表的な眼疾患にぶどう膜炎や感染性眼内炎がある。これらの眼炎症性疾患の誤った診断に基づく不適切な治療は重大な視機能障害を残すが、適切な診断・治療は容易ではない。近年、分子生物学の進歩により、眼科領域でも原因不明の疾患に多岐にわたる外来性抗原 (ウイルス, 細菌, 真菌, 寄生虫, 腫瘍など) が関与していることが判明してきた。しかし、眼の検体を用いた診断にいくつかの問題があるのが現状である。例えば、眼検体を用いた診断のジレンマとして常に少ない検体量であること、原因抗原が多様であること、また感染性眼炎症性疾患は進行が急激なケースがあり、診断および治療は時間との闘いであること、眼内リンパ腫は生命予後に直結する疾患であるが、その診断が容易ではないことなどが挙げられる。以前は、眼局所検体を用いたぶどう膜炎や眼内炎の診断検査では

得られる検体はごく微量の検体量しかなく、PCR (polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) を行っても 1~2 項目が限度であり、また検査感度もよくなかった。そのため、正確かつ迅速であり、また多岐にわたる外来性抗原を網羅する包括的な眼検体を用いた診断が必要であった。また、眼炎症性疾患の全身検査所見は参考程度にしかならない場合があり、その診断のために眼局所の直接的な原因抗原の同定などの状況証拠を得る必要があるのは事実である。

筆者らの施設では、その微量な眼検体を用いて、これらの眼炎症性疾患の病因となる多様な外来抗原を網羅的にスクリーニングし診断する検査システムを開発した¹⁾。現在では、眼科領域の微量検体でも迅速に、網羅的に多くの項目の核酸を検査できるシステムが構築され、実際に臨床応用された (マルチプレックス PCR)。さらにその核酸の量を定量化する検査が出現し (リアルタイム PCR)、また細菌全般、真菌全般を網羅する PCR

すぎた・すなお: 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科眼科学分野

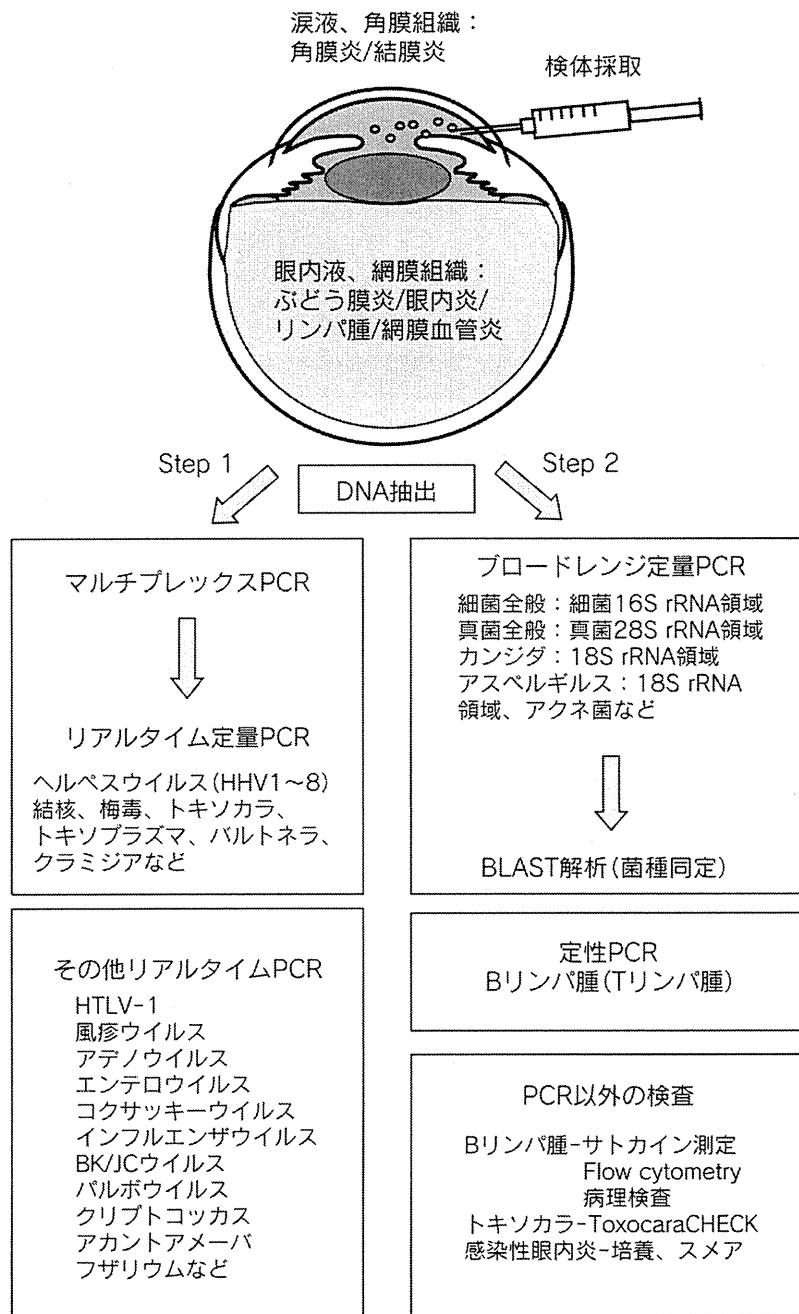


図1 眼炎症性疾患に対する網羅的診断検査

感染性ぶどう膜炎，網膜血管炎，感染性眼内炎，眼内リンパ腫などの活動性眼内炎症を有する患者から前房水，硝子体を採取する。角膜炎，結膜炎では，角膜擦過物や涙液，結膜組織を採取する。検体から核酸DNAを抽出し，PCRは2つのステップでスクリーニングを行う。ステップ1：ウイルスおよびぶどう膜炎マルチプレックスおよびリアルタイムPCR。ステップ2：細菌全般（細菌16S）および真菌全般定量PCR（真菌18S/28S）のブロードレンジ定量PCR。その他，必要な場合のみ各種ウイルスなどの定量PCRを施行する。眼内リンパ腫では一般的なPCR以外に，一部の細胞を病理検査，フローサイトメトリー検査に使用する。上記2つのステップのPCRスクリーニング検査は迅速（24時間以内）に行う。その後の別の検査も48時間以内に行う。

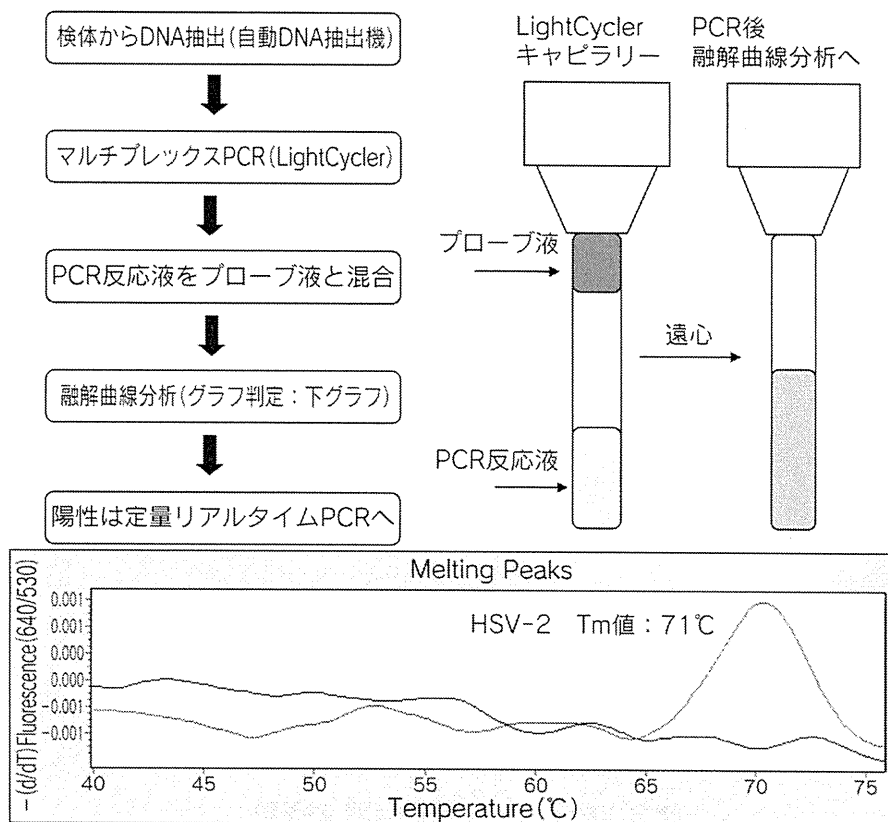


図2 マルチプレックス PCR 検査

マルチプレックス PCR (多項目迅速 PCR) 検査は、多い場合は 10 種類以上のウイルスなどの外来性抗原を同時に迅速に検出できる新しい PCR 検査である。眼局所検体から DNA を抽出後、Accuprime Taq を用いてそれぞれの抗原 DNA 特異的プライマーを混合して、マルチプレックス PCR を行う。数種類の抗原を数本のキャピラリーを用いて同時に検査する。PCR 後、プローブの混合液と PCR 産物を混合し、グラフ (melting curve) 解析を行い、ウイルスなどの抗原 DNA の検出を行う。これらは T_m 値 (melting temperature: 融解温度) が重ならないように設定したプローブによってその種類を判定するのが特徴である。この代表症例からは単純ヘルペスウイルス 2 型 (HSV-2) DNA が検出されていた (このウイルスの T_m 値は 71°C)。その後、リアルタイム定量 PCR を用いてその陽性抗原の定量化を行う。

検査も可能になった (ブロードレンジ PCR)。眼感染症は失明、眼内リンパ腫は生命予後にかかわるので、正確、迅速、かつ網羅的な診断検査システムの開発は必要不可欠である。本稿では、この最新のぶどう膜炎の網羅的診断法を紹介する。

ぶどう膜炎の網羅的診断法

図 1 に筆者らの施設での最新のぶどう膜炎の網羅的診断法を示す。対象疾患は眼炎症性疾患すべてとなる。感染性ぶどう膜炎、網膜血管炎、感染性眼内炎、眼内リンパ腫などの活動性眼内炎症

を有する患者からインフォームド・コンセントを得て、前房水、硝子体、また場合によっては術中に虹彩や網膜などの眼内組織を採取する。角膜炎、結膜炎などの眼表面炎症性疾患では、角膜擦過物や涙液、結膜組織を採取する。検体の処理は、検体を遠心分離し、沈渣の細胞成分のほとんどは核酸 DNA を抽出、また検体の上清は PCR 以外の検査 (サイトカイン測定、特異抗体測定、培養など) に使用する。核酸 DNA の抽出方法は、眼内液 (主に液体成分) と眼内組織 (主に固体組織) は別々の方法を用いる。

PCR は 2 つのステップでスクリーニングを行

細菌16S rRNA領域を用いたBroad-range real-time PCR

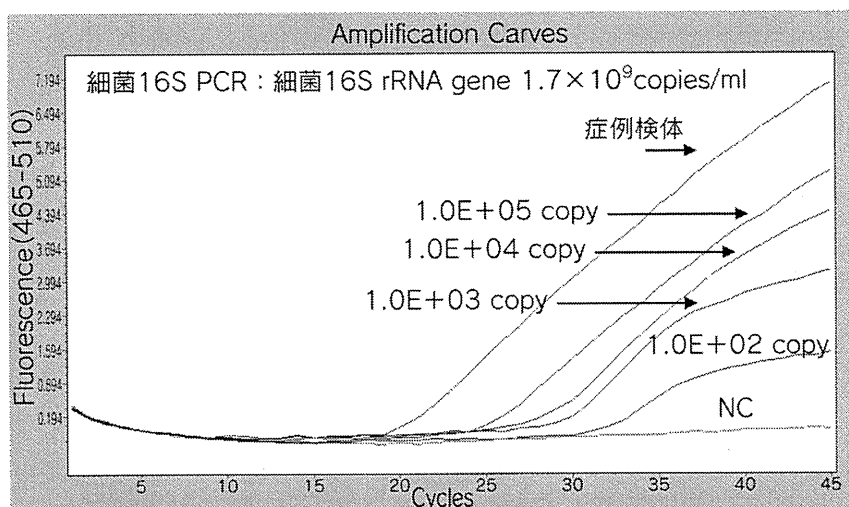
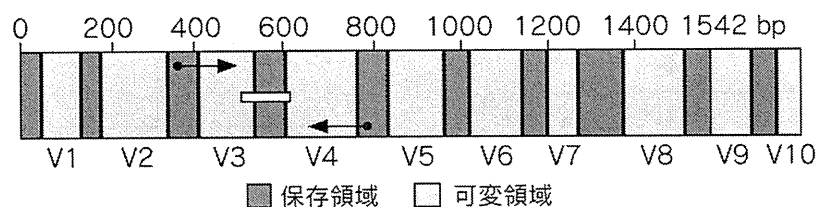


図3 ブロードレンジ PCR の原理

細菌全般を網羅するための細菌保存領域を増幅させるブロードレンジ PCR (細菌 16S rRNA gene)。真菌全般保存領域の増幅は、真菌 18S もしくは 28S リボソーム RNA 領域のブロードレンジ PCR が行われる。このブロードレンジ PCR を用いて、検体から細菌や真菌の DNA を迅速に検出でき、また定量 PCR を組み合わせることで検体内の菌の定量化ができる。細菌では、菌すべてが共通に保有する遺伝子領域 (保存領域) と菌種によって異なる遺伝子領域 (可変領域) が交互に存在し、その領域に 16S rRNA があり、その保存領域を使用して PCR を行うと理論的には細菌すべてを検出できる。筆者らは細菌 16S rRNA 領域の特異的なプライマーと TaqMan プロブを設計し、定量 PCR 検査を構築した。結果のグラフは、感染性眼内炎疑いの硝子体検体の細菌 16S PCR のもので、細菌 DNA が 1.7×10^9 copies/ml と高コピー数検出されていた。

う。ステップ1では、ウイルスおよびぶどう膜炎抗原のマルチプレックスおよびリアルタイム PCR、ステップ2では、細菌全般 (細菌 16S) および真菌全般定量 PCR (真菌 18S/28S) をブロードレンジ定量 PCR で行う (図1)。その他、必要な場合のみ各種ウイルスなどの定量 PCR を施行する。眼内リンパ腫では一部の細胞を一般的な病理検査、フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原解析に使用する。眼内液上清はサイトカイン測定を行う。また、サルコイドーシスなどの非感染性ぶどう膜炎でも感染を否定する目的で検体を

採取する場合がある。いずれの場合も検体量が少ないので効率的に使用する必要がある。

新しい PCR 検査—マルチプレックス PCR とリアルタイム PCR

筆者らはヒトヘルペスウイルス (human herpesvirus : HHV) 1~8 型の多項目迅速定性 PCR (別名、マルチプレックス PCR) とリアルタイム定量 PCR を組み合わせた遺伝子検査システムを確立し、その有効性についての報告^{1,2)}を行った。

活動性ぶどう膜炎患者より前房水採取

↓ DNA抽出

Multiplex PCR(多項目迅速PCR)

Broad-range real-time PCR(細菌/真菌)

PCR 検査: CMV(+)
HSV1(-), HSV2(-), VZV(-), EBV(-), HHV6(-), HHV7(-)
HHV8(-), JCV(-), BKV(-), parvo V B19(-)
トキソプラズマ(-), トキソカラ(-), Tb(-), 梅毒(-)
バルトネラ(-), クラミジア(-)
細菌16S(-), P. acnes(-), 真菌28S(-)

オプション: HTLV-1(-), アカントアメーバ(-), 風疹(-)
B細胞リンパ腫IgH(-)

CMVに対するReal-time PCR

↓

眼内にCMV-DNAが高コピー数検出(2.3×10^5)

↓

最終診断: サイトメガロウイルス虹彩毛様体炎

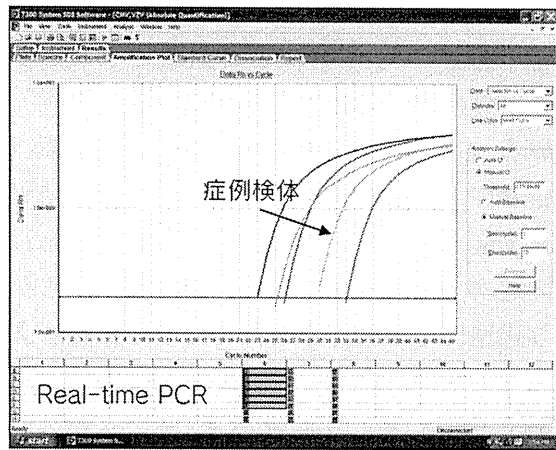
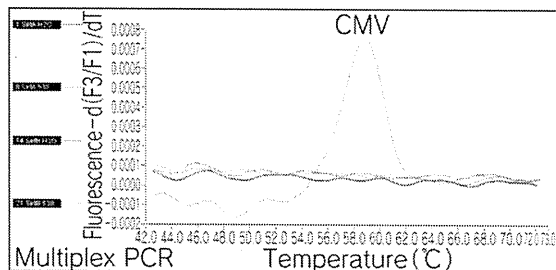


図4 PCRが有用であったサイトメガロウイルス(CMV)虹彩毛様体炎の1例
症例は56歳, 男性。Posner-Schlossman症候群の疑いで紹介受診。右眼のみに白色の角膜後面沈着物が数個付着し, 高眼圧を伴う軽度の前房細胞がみられ, 隅角を観察すると健眼に比べて患眼の色素脱失がみられていた。前房水のマルチプレックスPCRで, CMV-DNAが右上グラフのように検出されていた。PCRスクリーニング検査の特徴は同時に他のウイルスやぶどう膜炎抗原, また細菌16S, 真菌28Sなどの多種類のDNAも同時に測定可能で, この症例の同検体からはCMV以外の抗原DNAが検出されなかった。その後, CMVの定量PCRを施行し, 右下グラフのように眼局所CMV-DNAが高コピー数であったことから最終的にCMV虹彩毛様体炎と診断し, 治療を開始した。

PCRの具体的な方法は, マルチプレックスPCRはそれぞれの抗原となる特異的プライマーを用いて, LightCycler(ロッシュ社)でPCRを行う。このPCRの利点は, 10項目以上の外来性抗原DNAが同時に陽性か陰性かの判定ができ, スクリーニング検査として使用できること, サンプル調製からPCRにかかる時間はわずか1時間40分程度ととても迅速であること, 陽性曲線グラフが大きい場合は眼局所の抗原量が多いことがわかり, 半定量できることなどが挙げられる。その他の利点として, 眼表面炎症性疾患(角膜炎, 結膜炎など)の涙液検体は複数の外来性抗原が検出される可能性があり, このPCRは有用である。図2にそのPCR検査の流れを示した。

上記定性PCRスクリーニング検査で陽性であった外来抗原に関してその定量化を行うが, リ

アルタイムPCRを用いて解析する(LightCycler, ABI社7300systemなど)。偽陽性を避ける目的で, プライマーとプローブ配列はマルチプレックスPCRとは異なるように設定している。定量リアルタイムPCRの利点は, 治療前に眼内のDNAコピー数を把握できるために治療薬の量の決定, 使用タイミングの参考になることである。また, 何度か検体を採取できる場合には局所コピー数の推移によって治療薬の用法の参考となる。

新しいPCR検査 —ブロードレンジPCR

ブロードレンジPCR(図3)はリボソームRNA(rRNA)遺伝子を標的にしたPCRで, 原核生物では16S rRNA, 真核生物では18S/28S

rRNA といったそれぞれの種で保存された遺伝子を標的にしたものである。ほとんどの細菌が保有する遺伝子であるハウスキーピング遺伝子 16S rRNA (リボソームの蛋白合成に関与, 真菌の場合は 18S/28S) はよく用いられるハウスキーピング遺伝子の 1 つであり, これを検出することで菌の存在が証明できる。実際には世の中に存在する 3 万種以上の細菌の約 60~80% を網羅できるとされ, 眼科以外の臨床の場でも非常に重要な検査になっている。この PCR 陽性検体は 16S rRNA 領域を増幅させて, 直接シーケンスして, その結果を GeneBank データベースでブラスト解析を行い菌の同定までを行う。今後は一般的な細菌培養検査より迅速に菌の同定まで行うことができるようになると期待されている。筆者らはこの細菌 16S PCR とリアルタイム定量 PCR, またブラスト解析を組み合わせた遺伝子検査システムを確立し, 細菌性眼内炎検査に応用し, その有効性についての報告³⁾を行っている。

各種ぶどう膜炎/眼内炎/眼内リンパ腫の検査

■ウイルス性ぶどう膜炎の診断

ウイルスの診断は, ヘルペスウイルス属 1~8 型 (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8) までとレトロウイルスでぶどう膜炎の原因の HTLV-1 (proviral DNA) の検索を行う (図 1)。オプション検査として, アデノウイルス, エンテロウイルス, コクサッキーウイルス, 風疹ウイルス, また眼科関連性は不明の BK ウイルス, JC ウイルス, パルボウイルス B19, インフルエンザウイルスについても PCR を用いて検討する。ヘルペスウイルス属はいずれもマルチプレックス PCR でスクリーニングして, 陽性ウイルスのみリアルタイム PCR を用いてゲノムの眼局所の定量を行う。ウイルス感染の場合は PCR 検査が有効 (図 4) で, 疾患によっては Q 値測定 (眼内特異抗体) を行う。

■眼内寄生虫の診断

代表的なトキソプラズマとトキソカラの検査を行う。眼トキソプラズマ症は定性・定量 PCR を用いてゲノムの同定を, 眼トキソカラ症 (イヌ回虫, ネコ回虫) はトキソカラチェック (ToxocaraCHECK, 抗体定性検査) を用いて眼内特異抗体の同定および PCR も行う (図 1)。トキソプラズマの場合, PCR が有効であるが, トキソカラは筆者らの経験では PCR よりも眼内特異抗体の証明が有用である。

■その他ぶどう膜炎/角膜炎/結膜炎の原因診断

ぶどう膜炎の原因となる病原体で, 結核菌, 梅毒トレポネーマ, バルトネラ菌 (猫引つ掻き病), 角膜炎には梅毒トレポネーマ, 結膜炎にはクラミジアがある (図 1)。これらの外来性抗原の定性および定量 PCR を用いてゲノムの同定を行うが, 全身検査も有効 (例えば, 結核ではツベルクリン皮内テスト) である。アカントアメーバ角膜炎の症例検体では角膜擦過物の鏡検が有用で, 加えて定量 PCR を補助検査として用いる。

■細菌性眼内炎の診断

眼内炎の診断には, 一般的な培養, Gram 染色, Giemsa 染色に加えてブロードレンジ PCR (細菌 16S リボソーム RNA 領域) も行う (図 3)。この PCR 陽性検体は, 16S rRNA 領域を増幅させて, 直接シーケンスして菌の同定までを行う。眼科の遅発性眼内炎の代表細菌, *Propionibacterium acnes* (アクネ菌) は培養検査では嫌気性菌のため同定されにくい, あるいは培養結果に時間を要することから定量 PCR 検査が有用である。

■真菌性眼内炎の診断

真菌が疑われる場合, 培養, スメアおよびブロードレンジ PCR (真菌 28S リボソーム RNA 領域) が行われる (図 1)。その他, 眼科関連性が高いカンジダ, アスペルギルス, フザリウムそれぞれの定量 PCR も行う。

■眼内腫瘍の診断

仮面症候群を呈する眼内リンパ腫診断は重要である。一般的な病理診断以外に、眼内液を利用した PCR で IgH 再構築 (B 細胞系) を行う (図 1)。同時に検体の上清を使用して ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay : 酵素免疫抗体法) によるサイトカイン測定を行うが、この IL-10, IL-6 の値も補助診断として有用である⁴⁾。

|| おわりに

この新しい検体検査システムの効果として、眼炎症性疾患の原因となる外来性抗原を迅速に短時間で同定することができ、早期診断、早期治療へとつながる^{5~8)}ことが期待される。また、眼局所の遺伝子の定量化を行い、治療薬の決定や量の参考となる。さらに原因不明の眼炎症性疾患から新しい外来性抗原が同定される可能性がある^{9,10)}。加えて、原因特定以外に感染性疾患や腫瘍性疾患を除外することができることから、臨床の場で重要な検査となることが期待される。

文献

- 1) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K et al : Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol* **92** : 928-932, 2008
- 2) 杉田 直・岩永洋一・川口龍史・他 : 急性網膜壊死患者眼内液の多項目迅速ウイルス PCR およ

びリアルタイム PCR 法によるヘルペスウイルス遺伝子同定. *日眼会誌* **112** : 30-38, 2008

- 3) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K et al : Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* **95** : 345-349, 2011
- 4) Sugita S, Takase H, Sugamoto Y et al : Diagnosis of intraocular lymphoma by polymerase chain reaction analysis and cytokine profiling of the vitreous fluid. *Jpn J Ophthalmol* **53** : 209-214, 2009
- 5) Kido S, Sugita S, Horie S et al : Association of varicella-zoster virus (VZV) load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpete. *Br J Ophthalmol* **92** : 505-508, 2008
- 6) Takahashi H, Sugita S, Shimizu N et al : A high viral load of Epstein-Barr virus DNA in ocular fluids in a HLA-B27 negative acute anterior uveitis patient with psoriasis. *Jpn J Ophthalmol* **52** : 136-138, 2008
- 7) Yamamoto S, Sugita S, Sugamoto Y et al : Detection of genomic DNA from Epstein-Barr virus in ocular fluids of patients with uveitis. *Jpn J Ophthalmol* **52** : 463-467, 2008
- 8) Miyanaga M, Sugita S, Shimizu N et al : A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. *Br J Ophthalmol* **94** : 336-340, 2010
- 9) Kawaguchi T, Sugita S, Shimizu N et al : Kinetics of aqueous flare, intraocular pressure and virus-DNA copies in a patient with cytomegalovirus iridocyclitis without retinitis. *Inter Ophthalmol* **27** : 383-386, 2007
- 10) Sugita S, Shimizu N, Kawaguchi T et al : Identification of human herpesvirus 6 in a patient with severe unilateral panuveitis. *Arch Ophthalmol* **125** : 1426-1427, 2007

